



Studies of interaction of actin to aplyronine A, a potent antitumor macrolide of marine origin

著者	黒田 武史
内容記述	Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (A), no. 4570, 2008.3.25 "February 2008"--Cover Includes bibliographical references
発行年	2008
URL	http://hdl.handle.net/2241/111085

氏 名 (本籍)	黒 ^{くろ} 田 ^だ 武 ^{たけ} 史 ^し (栃 木 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4570 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	数理物質科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Studies of Interaction of Actin to Aplyronine A, a Potent Antitumor Macrolide of Marine Origin (海洋産抗腫瘍性マクロライド化合物アプリロニン A とアクチンの相互作用 に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	木 越 英 夫
副 査	筑波大学教授	理学博士	関 口 章
副 査	筑波大学教授	工学博士	鍋 島 達 弥
副 査	筑波大学教授	理学博士	市 川 淳 士

論 文 の 内 容 の 要 旨

海洋軟体動物アメフラシより単離されたアプリロニン A (apA) は、非常に強い抗腫瘍活性を有するマクロライド化合物である (P388 白血病マウスに対する延命率 545%)。apA は、細胞骨格タンパク質であるアクチン繊維に対して脱重合作用を有するので、新奇な作用機所を持つ抗腫瘍性物質として、その作用機所の解明が期待される。そこで本研究では、光アフィニティー反応及び X 線結晶構造解析を手法として、アクチンに対する apA 結合部位の解明研究を行った。以下に、本研究の成果を述べる。

apA のアクチン脱重合活性には、側鎖部分の構造が重要な役割を果たすことが報告されている。そこで、光アフィニティー実験においてリガンド部として用いる目的で、apA の側鎖部分の構造のみを有する人工類縁体を合成した。さらに、apA と類似の側鎖構造を持ち、apA よりも 10 倍強いアクチン脱重合能を有しながらも、抗腫瘍性を全く示さないマクロライド化合物、ミカロライド B (myB) の側鎖部分に相当する人工類縁体とそのジアステレオマーを合成した。これらの分子のアクチン脱重合活性を測定したところ、apA 側鎖部分の人工類縁体は、apA の 1/5 のアクチン脱重合活性を有することを明らかとした。また、myB の側鎖類縁体が強いアクチン脱重合能を保持すること、その活性の強さは、エステル部の立体化学によって変化する事を解明した。

ついで、アクチン- apA 複合体の結合様式を明らかにする目的で、光アフィニティーラベル化法を適用することとした。検討の結果、リガンド部として apA の側鎖類縁体を、光アフィニティー基として反応性が高く扱いが容易なトリフルオロメチルジアジリン基を、検出基として蛍光基であるフルオロセイン基を用いたプローブ分子を設計・合成した。光アフィニティー実験の結果、蛍光基を有するプローブによってアクチンがラベル化された。また、apA による阻害実験の結果、プローブが apA と同じ位置でアクチンに対して結合していることが示された。

次に、既存のアクチン脱重合物質であるサイトカラシン D (CD)、ラトランクリン B (LatB)、及び myB を用いて、競合阻害実験を行った。その結果、myB は apA 結合部位と同じ部位でアクチンと結合するこ

とが分かった。また、CD 及び LatB の結合部位は、apA の結合部位とは無関係な位置であることが示された。

続いて、光反応後の反応混合物を酵素分解し、質量スペクトルを用いてラベル化ペプチド断片の分析を行った。その結果、アクチンのサブドメイン 1 に相当するラベル化ペプチド断片 Y337-K359 に相当する分子量を有する分子イオンピーク m/z 3852 を検出した。このことは、myB と構造が非常に類似した化合物カビラミド C (kaC) とアクチンの複合体結晶構造 (2003 年, Klenchin ら) における kaC 結合部位を支持する結果であった。

アクチン-apA 複合体の結晶に対して X 線結晶構造解析を行い、1.45 Å の分解能で立体構造を決定した。その結果、アクチンに対する apA 結合部位は、サブドメイン 1 とサブドメイン 3 の間の疎水性クレフトであるということを明らかにした。この結果は、前章の光アフィニティーラベル化実験によって推定された apA 及び myB 結合部位と矛盾なく一致し、本結晶構造が溶液状態における複合体の構造を反映していることが化学的に示された。

結晶中での結合の様子を詳しく精査したところ、apA は、側鎖部分を用いてアクチンと強く結合していることが分かった。また、その結合様式は抗腫瘍性を持たない類縁体 kaC の結合様式と非常によく一致していた。一方、ラクトン環部分の結合様式に関しては、kaC の複合体では、トリソオキサゾール部とアクチンの α -ヘリックスとの疎水性相互作用を利用し、サブドメイン 1 に対して環部分が結合しているのに対して apA の環部分は、主にサブドメイン 3 と相互作用していることが明らかとなった。また、apA のジメチルアニル基、トリメチルセリル基は、複合体表面から張り出すような立体配座をとっていた。

本研究では、光アフィニティーラベル化法と、X 線結晶構造解析の 2 通りの手法を用いて、アクチンに対するアプリロニン A (apA) 結合部位を決定した。人工類縁体の構造活性相関研究及び結晶構造に対する詳細な考察から、アクチン脱重合マクロライド群の細胞毒性は、環部分の構造によって強められていることが明らかとなった。また、apA と他のマクロライド群とでは、環部分の結合様式が異なっていることを解明した。これらのことから、環部分の構造の違いが、抗腫瘍性の発現に影響を与えることが示唆した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、天然有機化合物の制がん性に関わると考えられる生物活性 (アクチン脱重合活性) に関わる重要な部分構造を化学合成し、それらの構造活性相関を明らかにした。さらに、新規の蛍光標識光アフィニティプローブを設計し、対象タンパク質を蛍光標識できることを示すとともに、このプローブを用いて、他のアクチン脱重合化合物の結合位置に関する知見を得る方法を開発した。加えて、タンパク質-天然物の結晶構造を解析し、その構造的特徴を明らかにした。これらの結果から、制がん性に関わると考えられる構造因子を提案した。これらの結果は、生物活性天然有機化合物の生物活性発現機構を分子構造レベルで解明するものであり、高く評価される。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。